

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Johana Hanzlíčková**

Evolve a systematika lakušníků (*Ranunculus* sect. *Batrachium*)  
Evolution and systematics of water-crowfoots (*Ranunculus* sect. *Batrachium*)

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jan Prančl

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2017

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Mgr. Janu Prančlovi za jeho cenné rady, trpělivost a přátelský přístup. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu nejen při psaní bakalářské práce, ale i během celého mého studia.

## Abstrakt

Sekce lakušník (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) je jednou z nejvíce komplikovaných skupin vodních rostlin. Uplatňují se zde procesy polyploidizace (je známo celkem pět ploidních úrovní) a hybridizace, které se společně podílí na výsledné retikulární evoluci celého rodu *Ranunculus*. Nově vzniklí hybridy a polyploidy mohou být navíc v přírodě fixovány díky klonálnímu růstu nebo autogamii. Fenotypová plasticita a značná morfologická redukce přispívají k taxonomické složitosti skupiny a v kombinaci s mikroevolučními procesy vedou k existenci kryptické variability v rámci sekce. Z těchto důvodů je možno říci, že současné taxonomické členění je nepřesné a vyžaduje zásadní revizi. Práce zahrnuje také stručný úvod ke kryptickému komplexu *Ranunculus trichophyllus* agg., jež bude předmětem navazující diplomové práce, a přehled metod, které budou při dalším studiu použity.

**Klíčová slova:** *Ranunculus* sect. *Batrachium*, hybridizace, polyploidizace, kryptické taxony, *Ranunculus trichophyllus* agg.

## Abstract

Water-crowfoots (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) are among the most complicated groups of aquatic angiosperms. Processes such as polyploidization (there are five known ploidy levels) and hybridization play the main role in evolution of the subgenus, resulting into the reticulate evolution of the whole genus *Ranunculus*. Furthermore, newly established hybrids and polyploids can be fixed in nature via clonal growth or autogamy. Phenotypic plasticity and considerable morphological reduction contribute to the taxonomic complexity of the group and in combination with microevolutionary processes lead to the existence of cryptic variation. Therefore it can be said that the current taxonomic classification is dubious and requires a revision. The thesis also includes a brief introduction to the cryptic species complex *Ranunculus trichophyllus* agg. and a description of methods which will be applied in following master thesis.

**Key words:** *Ranunculus* sect. *Batrachium*, hybridization, polyploidization, cryptic taxa, *Ranunculus trichophyllus* agg.

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Charakteristika sekce.....</b>	<b>2</b>
2.1.	Zařazení v systému cévnatých rostlin.....	2
2.2.	Morfologie.....	3
2.2.1.	Listy .....	3
2.2.2.	Palisty.....	5
2.2.3.	Nektária.....	6
2.2.4.	Květní lůžko .....	7
2.3.	Rozmnožovací systémy .....	7
<b>3.</b>	<b>Charakteristika jednotlivých druhů .....</b>	<b>9</b>
3.1.	Taxonomické pojetí skupiny .....	9
3.2.	Morfologické znaky.....	10
3.3.	Ekologie a rozšíření .....	15
3.4.	Karyologie .....	17
<b>4.</b>	<b>Mikroevoluční procesy jako zdroj variability.....</b>	<b>19</b>
4.1.	Polyploidizace .....	19
4.2.	Hybridizace .....	20
<b>5.</b>	<b>Navazující diplomová práce .....</b>	<b>23</b>
5.1.	Otázky .....	24
5.2.	Metodika.....	25
5.2.1.	Průtoková cytometrie .....	25
5.2.2.	Molekulární metody .....	26
5.2.3.	Morfometrická analýza .....	28
5.3.	Výsledky předběžných analýz pomocí průtokové cytometrie.....	28
<b>6.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>30</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>31</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>39</b>

# 1. Úvod

Při procesu speciace neboli vzniku nových druhů se v rostlinné říši jako jedny z nejvýznamnějších faktorů uplatňují procesy polyploidizace a hybridizace. Polyploidizace může vést k rychlému vzniku nových druhů zejména díky tvorbě reprodukční bariéry často již v rámci jedné generace a je zřejmě nejčastějším nástrojem sympatrické speciace (Wood et al. 2009). Tyto fenomény se uplatňují různou měrou u jednotlivých skupin rostlin a dávají vzniknout značné diverzitě, která nemusí být vždy rozpoznána. Jednou ze skupin, kde lze takovou kryptickou diverzitu ve zvýšené míře očekávat, jsou vodní makrofyty. Vodní rostliny díky svému specifickému prostředí výskytu velice často vykazují značnou morfologickou redukci a zároveň fenotypovou plasticitu, oba tyto procesy přispívají k obtížné determinaci jednotlivých taxonů na základě morfologických znaků. Jejich vzhled je často daleko více ovlivňován environmentálními faktory než jejich genotypem, což může vést k morfologické konvergenci a tudíž i ke vzniku kryptické variability. Nacházíme u nich proto množství kryptických taxonů, tedy různých evolučních linií, jež jsou geneticky odlišné a reprodukčně izolované, avšak morfologicky na první pohled od sebe nerozeznatelné (Bickford et al., 2007).

Jednou ze skupin, jež se zdá být ideálním modelem pro studium takovéto kryptické variability, jsou lukušníky (*Ranunculus* subg. *Batrachium* DC.). Tato sekce je zřejmě nejkomplikovanější skupinou vodních rostlin v Evropě. Zahrnuje asi 25 druhů s výskytem převážně na severní polokouli. Centrem druhové diverzity této sekce je atlantská a středozevní Evropa (Cook, 1963, Cook 1966a). Jako u mnoha dalších vodních rostlin se na taxonomické složitosti této skupiny podílí zejména mikroevoluční procesy, které zde probíhají. Dochází zde k polyploidizaci, přičemž je známo 5 různých ploidních úrovní – od diploidů až po hexaploidy, a rovněž k hybridizaci, někdy následované introgresí. Nově vzniklí hybridy nebo polyploidy mohou být navíc v přírodě fixováni díky klonálnímu růstu nebo autogamii (Cook, 1966a, Cook 1970, Dahlgren 1991). Tyto procesy se odrážejí v projevech některých unikátních morfologických znaků, jako je schopnost tvorby různého typu listů v rámci jedné rostliny (heterofylie). Přestože lukušníky představují skvělý model pro studium evolučních procesů, byla tato skupina od monografie C. D. Cooka z roku 1966 studována spíše na regionální úrovni a její problematika nebyla tudíž zkoumána v celé šíři. Na základě moderních molekulárních analýz se nyní ukazuje, že současné taxonomické řazení je nepřesné a vyžaduje zásadní revizi (Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Tato práce si klade za cíl shrnout dosavadní vývoj pohledu na taxonomické zařazení této sekce a problematiku jednotlivých druhů a podat informace o mikroevolučních procesech, které mohou být příčinou existující variability. Jelikož za hlavní centrum evoluční diverzity lakušníků je považována atlantská a středozevní Evropa, budou v práci podrobněji zahrnuty druhy s výskytem na území Evropy. Práce bude zároveň výchozím textem pro navazující diplomovou práci, v níž se budu zabývat kryptickou variabilitou této sekce podrobněji.

## 2. Charakteristika sekce

### 2.1. Zařazení v systému cévnatých rostlin

Sekce lakušník (*Ranunculus* sect. *Batrachium* DC.) patří do čeledi *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité). Tato čeleď v systému krytosemenných rostlin podle APG IV náleží do řádu *Ranunculales* (pryskyřníkotvaré) v rámci vyšších dvouděložných (eudicots; Angiosperm Phylogeny Group, 2016).

Lakušníky byly nejprve v rámci klasifikace zařazovány na úrovni sekce rodu *Ranunculus* (De Candolle, 1818), později jako samostatný rod *Batrachium* (S. F. Gray, 1821). Jako podrod byly prvně popsány v roce 1886 A. Grayem (Gray, 1886) a na této úrovni byly akceptovány i v rámci rozsáhlé monografie C. D. K. Cooka (1966a). Klasifikace nicméně není ani nyní jednotná a regionálně se liší. Pro zařazení do samostatného rodu přispívá morfologická a ekologická odlišnost, která je však spíše zdánlivá, jelikož vodní prostředí jsou schopny osidlovat i některé jiné druhy pryskyřníků. K takovým druhům se řadí zejména někteří zástupci příbuzné sekce *Hecatonia*. Například *Ranunculus flabellaris* a *Ranunculus gmelinii* jsou zároveň oba schopny vytvářet plovoucí a nitřovité typy listů (Hörandl et al., 2005). Rovněž jeden ze zástupců české flóry *R. sceleratus* dokáže vytvářet podobné plovoucí listy a bývá díky tomu dokonce s lakušníky někdy zaměňován. Mezi morfologické znaky, jejichž kombinace vymezuje lakušníky v rámci pryskyřníků, patří zejména absence škrobu v korunních lístcích, přítomnost blanitých palistů, redukovaný typ nektárií a tvar nažek s příčnými žebry a se zobánkem kratším délky nažky (Benson, 1940, Cook, 1963, Hörandl & Emadzade, 2012). Tyto znaky jsou však v určité formě přítomny i u jiných vodních zástupců rodu *Ranunculus*, jsou tedy zřejmě pouze adaptací na vodní prostředí. Nelze je proto považovat za dostatečně unikátní pro to, aby na základě jejich přítomnosti byl lakušníkům přiřazen status samostatného rodu (Cook, 1966a, Hörandl et al., 2005).

Recentní fylogenetická studie rodu *Ranunculus* vymezila lakušníky jako monofyletickou skupinu v rámci pryskyřníků. Jsou zařazeny v sekci *Batrachium*, jejímiž sesterskými sekcemi jsou sect. *Hecatonia* a sect. *Pseudadonis* (Hörandl & Emadzade, 2012; viz Přílohu 1). Z jedné z předchozích studií zabývajících se fylogenetickými vztahy rodu *Ranunculus* vyšlo rovněž mimo jiné najevo, že druhy sekce *Batrachium* mají retikulární vztahy jak mezi sebou, tak s druhy z příbuzných sekcí *Xanthobatrachium* a *Hecatonia* (Hörandl et al., 2005; viz Přílohu 2). Tento fakt je dalším argumentem, proč se zařazení lakušníků do samostatného rodu nezdá být opodstatněné.

## 2.2. Morfologie

Rostliny jsou jednoleté nebo vytrvalé, větvení je sympodiální, listy jsou střídavé, ačkoli u druhů *R. omiophyllus*, *R. hederaceus* a *R. tripartitus* mohou v nekvetoucím stavu vznikat střídavě větve výrazně kratší a delší, a pak jsou listy zdánlivě vstřícné. Květy jsou jednotlivé, terminální. Korunní lístky jsou matné, bez obsahu škrobu, u většiny druhů bílé se žlutou skvrnou při bázi, u druhu *R. ololeucos* se však vyskytují populace s květy čistě bílými a u druhu *R. flavidus* jsou naopak květy zbarvené celé bledě žlutě (Cook, 1966a). Nažky jsou krátce zobánkaté a pokryté příčnými žebry, mezi kterými je ztenčené oplodí (Cook, 1963).

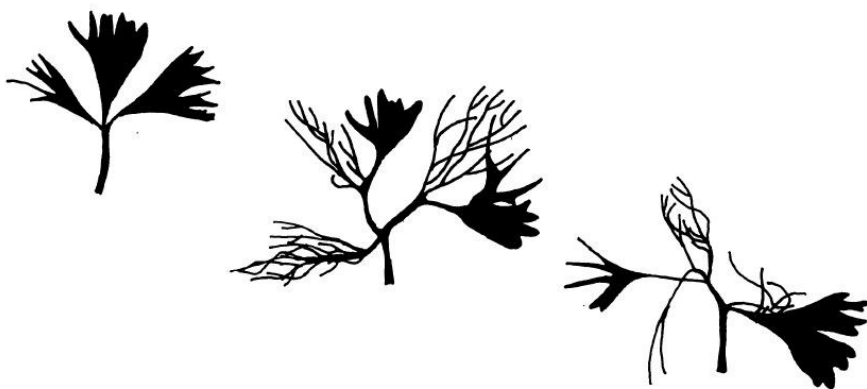
### 2.2.1. Listy

U lakušníků nacházíme dva typy listů: listy lupenité, jež jsou zpravidla plovoucí na hladině, a listy nit'ovité, které se formují buď ponořené, nebo v terestrickém prostředí. Nit'ovité listy jsou tvořeny větvenými úkrojky, kdy první dvě větvení jsou trichotomická a následná dělení dichotomická. Ponořená forma těchto listů má úkrojky zpravidla delší, na průřezu okrouhlé, zatímco terestrická forma má segmenty kratší, zploštělé, na průřezu eliptické. Ponořené nit'ovité listy mají zpravidla také tmavší barvu, epidermis je tvořena velkými buňkami s mnoha chloroplasty a listový mezofyl obsahuje jen malý počet chloroplastů. Terestrická forma těchto listů má oproti tomu barvu světlejší, epidermis s malými buňkami a nízkým počtem chloroplastů, jichž je daleko více v listovém mezofylu, mezofyl rovněž vykazuje určitou míru diferenciaci na palisádový a houbovitý. Na nit'ovitých listech terestrického typu jsou vytvořeny funkční průduchy, jichž je větší množství na adaxiální straně. U nit'ovitých ponořených listů jsou průduchy nefunkční, nebo vytvořeny vůbec nejsou. Terestrické nit'ovité listy jsou také mezidruhově daleko podobnější než listy ponořené (Cook 1966a, Cook, 1969).



Lupenité listy mají dlanitou žilnatinu, jejich plochá čepel je dlanitolaločná až dlanitosečná v úkrojky nejružnějšího tvaru, přičemž jednotlivé úkrojky jsou na vrcholu ještě různým způsobem vroubkované až zubaté (Husák et al., 1988, Prančl & Kaplan, 2017). Tvar lupenitých listů je ovlivněn environmentálními faktory, to se může projevit změnou hloubkou zářezů mezi jednotlivými laloky nebo různými deformacemi. Existují také přechodné typy listů, jež jsou kombinací charakterů listů lupenitých a nit'ovitých. Jejich tvorba může být podmíněna změnou podmínek prostředí, ale mohou indikovat také hybridní původ jedince, jelikož jejich přítomnost, hlavně pokud je jich vytvořeno větší množství v rámci jedné rostliny, často koreluje se sníženou fertilitou (Cook, 1963, Cook, 1966a). Přechodné typy listů mohou být mozaikovitě – s odlišenými částmi lupenitého a nit'ovitého charakteru (viz Obr. 1), či vykazovat charakter plynulého přechodu znaků obou typů (Englmaier, 2016).

Vývoj listů byl detailně popsán pro druh *R. aquatilis*: z listového primordia se postupně vytváří laloky, jejichž počet je do určitého stádia stejný pro lupenité i nit'ovité listy, později se pro nit'ovité listy vytváří větší počet laloků. Tvar listu je determinován délkou fotoperiody a tím, zda je vzrostný vrchol ponořen pod vodu. Při příliš krátké fotoperiodě jsou rostliny schopny tvořit listy pouze nit'ovitého ponořeného typu. Při dostatečně dlouhé fotoperiodě, pokud je vzrostný vrchol ponořen pod vodu, mohou rostliny vytvářet lupenité plovoucí listy. Pokud vzrostný vrchol pod vodu ponořen není, vytvářejí se při dlouhé fotoperiodě listy nit'ovitého terestrického typu. Při přechodu z vývoje nit'ovitých na vývoj lupenitých listů může dojít k vytvoření listů mozaikovitých. Jevem, který takovéto vývojové přechody často zapříčiňuje, je rychlé kolísání vodní hladiny (Cook, 1969).



**Obr. 1 - Mozaikovitě listy *Ranunculus aquatilis*. Převzato (Cook, 1969).**

Různé druhy potom disponují různou mírou schopnosti vytvářet tyto typy listů (viz Tab. 1). Listy pouze lupenité bez ohledu na prostředí, ve kterém se nacházejí, vytváří druhy *R. omiophyllus* a *R. hederaceus*. Schopností heterofylie, tedy tvorby různých typů listů v rámci jedné rostliny, disponuje asi devět druhů. Zbytek druhů vytváří potom listy pouze niťovité (Cook, 1963).

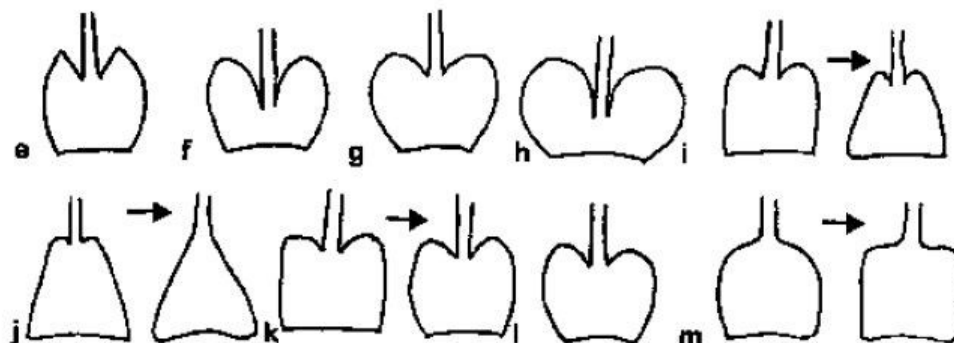
Projevy heterofylie se u jednotlivých druhů disponujících touto schopností liší, například *R. peltatus* vytváří lupenité listy za květu téměř vždy, není-li v terestrickém prostředí. Oproti tomu druhy *R. baudotii* a *R. aquatilis* najdeme za květu častěji bez lupenitých listů a druh *R. penicillatus* má dokonce populace rostlin, jež stabilně tvoří pouze niťovité listy (Englmaier, 2016).

Schopnost tvorby více než jednoho typu listů přináší rostlinám zásadní výhodu zejména v proměnlivém prostředí (Wells & Pigliucci, 2000). U druhů rostoucích v rychle tekoucích vodách je důležitou vlastností ponořených niťovitých listů jejich značná mechanická odolnost. Niťovité listy mají také větší specifickou listovou plochu, což je důležité pro získávání slunečního záření nutného pro fotosyntézu, jehož dostupnost je ve vodním prostředí snižena. Heterofylie přináší rostlinám rovněž více možností, co se týče příjmu uhlíku. Zatímco ponořené niťovité listy jsou schopné ve vodním prostředí, kde je molekulárního oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) nedostatek, přijímat uhlík ve formě hydrogenuhlíčitanu ( $\text{HCO}_3^-$ ), plovoucí lupenité listy a terestrické niťovité listy mohou fixovat vzdušný oxid uhličitý (Nielsen & Sand-Jensen, 1993). Lupenité listy mohou také přinést rostlinám výhodu při kompetici s jinými druhy rostlin, které mohou omezovat přístup světla k ponořeným listům (Cook, 1966a). Nielsen & Sand-Jensen pro *R. peltatus* uvádějí, že přínos lupenitých listů pro rostlinu, co se týče fixace uhlíku, není velký a je tedy spíše pravděpodobné, že plovoucí listy slouží k nadnášení kvetoucích částí rostlin, aby mohly být nad hladinou květy opyleny.

### 2.2.2. Palisty

Palisty se vytvářejí během růstu z části listového primordia. Tvorba laloků, ze kterých palisty následně vznikají, předchází růst vlastního listu (Cook, 1963). Ve stádiu pupene je vzhled palistů různých druhů velice podobný, zatímco na starších částech stonků mohou být palisty potrhány, proto jsou pro správnou determinaci nejlepší palisty prvního zcela rozvinutého listu. Pro konkrétního jedince je tvar palistů zřejmě konstantní, stejně tak u heterofylních druhů jsou palisty niťovitých i plovoucích listů srovnatelné. Určovacím znakem

kromě tvaru palistů (viz Obr. 2) může být také to, do jaké míry jsou srostlé s řapíkem listu. Kvůli vnitrodruhové tvarové variabilitě a přechodům mezi jednotlivými druhy je použití tvaru palistů jako určovacího znaku obtížné (Cook, 1966a, Rich & Jermy, 1998).

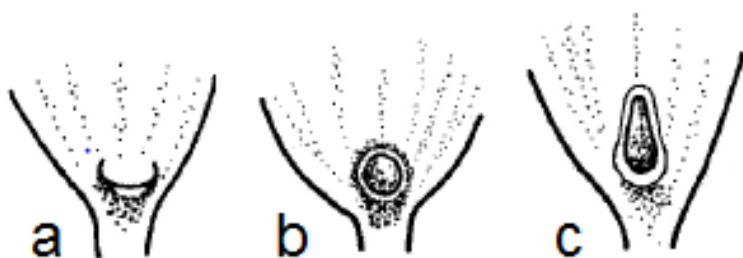


**Obr. 2 – Tvary palistů: e) *R. hederaceus*, f) *R. omiophyllus*, g) *R. tripartitus*, *R. penicillatus*, h) *R. baudotii*, i) *R. peltatus*, j) *R. aquatilis*, k) *R. trichophyllus*, l) *R. circinatus*, m) *R. fluitans*. Převzato (Rich & Jermy, 1998).**

### 2.2.3. Nektária

Nektária na bázi korunních lístků u sekce *Batrachium* patří k nejredukovanějším v rámci rodu *Ranunculus* (Benson, 1940). Tvar valu kolem jamky nektária je důležitým determinačním znakem, je ale třeba sledovat plně vyvinuté korunní lístky. Mladé korunní lístky v poupatech totiž mohou procházet vývojem přes stádia, kdy jsou nektária zaměnitelná za jiný typ, než jakého dosahují ve zralosti, a nektária odumírajících korunních lístků mohou být časem zdeformována (Cook, 1966a).

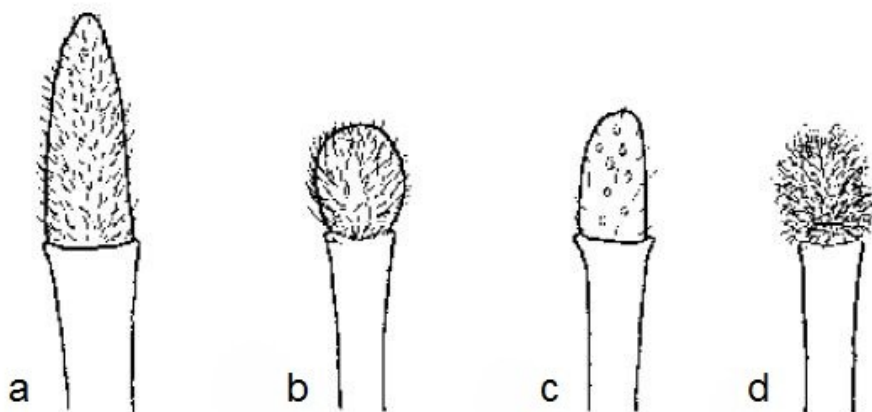
Původní rozeznávané typy nektárií jsou tři: nektárium poloměsíčité, nektárium okrouhlé a nektárium hruškovité (viz Obr. 3) (Cook, 1966a). Vyjma těchto základních typů byly také zdokumentovány přechodné typy a současně i variabilita vzhledu nektárií v rámci jedinců i populací (Wiegand, 1988). U některých polyploidů a hybridů byl také navíc nalezen větší počet nektárií v rámci jednoho korunního lístku (Dahlgren, 1992). Následně bylo navrženo jemnější členění na osm různých typů nektárií a rovněž byl nastíněn jejich možný evoluční vývoj (Dahlgren, 1992). I v případě tohoto jemnějšího členění byly nalezeny přechodné typy, a to u populací, které byly autorkou studie považovány za hybridní. Jelikož toto novější dělení neodstraňuje problém s přechodnými typy ani neodráží taxonomickou příslušnost přesněji než tradiční dělení, bylo v podstatě používáno jen jeho autorkou Gertrud Dahlgren a v určovací literatuře se dále neobjevuje.



**Obr. 3 – Typy nektárií: a) poloměsíčitý, b) okrouhlý, c) hruškovitý. Převzato a upraveno (Rich & Jermy, 1998).**

#### **2.2.4. Květní lůžko**

Užitečným určovacím znakem může být charakter květního lůžka (viz Obr. 4). Tento znak je vhodné sledovat za plodu, ideálně po vypadání všech nažek. Lůžko může nabývat tvaru kulovitého nebo vejcovitého až kuželovitého. Na základě míry pokrytí trichomy rozlišujeme dále květní lůžka lysá, řídce chlupatá a hustě chlupatá (Cook, 1966a, Englmaier, 2016).



**Obr. 4. – Květní lůžka: a) kuželovité, b) kulovité, c) řídce chlupaté, d) hustě chlupaté. Přejato (Rich & Jermy, 1998).**

### **2.3. Rozmnožovací systémy**

V tekoucích vodách je podobně jako u jiných druhů vodních rostlin významnou cestou k rozšiřování lakušníků vegetativní rozmnožování pomocí fragmentů lodyh. Vegetativní cestou se mohou v přírodě udržet i nově vzniklí hybridy a polyploidy, jež by jinak nemuseli být schopni se dále šířit. Ve stojatých vodách potom hraje hlavní roli rozmnožování pohlavní (Cook, 1966a, Lambertini et al., 2017).

Květy těchto rostlin jsou oboupohlavné, protogynické, blizna tedy v květu dozrává dříve než prašníky. Rostliny většiny druhů jsou schopny přijímat vlastní pyl (jsou self-

kompatibilní) a významnou roli u nich hraje samosprášení (autogamie). Prašníky často dozrávají již před otevřením květu a pestíky (v případě velkokvětých druhů pouze jejich vnitřní kruh) jsou tak opyleny ještě v poupěti vlastním pylem (Cook, 1966a). Výjimku by zřejmě mohl tvořit velkokvětý druh *R. peltatus*, který se zdá být adaptován na sexuální rozmnožování cizosprášením. Dle výsledků opylovacích pokusů s rostlinami z jihu Švédska se *R. peltatus* choval jako self-inkompatibilní, jelikož po opylení vlastním pylem netvořil semena (Hong, 1991). Jinými autory (např. Cook, 1966a) však self-inkompatibilita u tohoto druhu zaznamenána nebyla. Self-inkompatibilita byla zdokumentována také u dvou polských populací druhu *R. penicillatus*, je však nutno podotknout, že se jednalo o výsledky stanovené pouze na základě cyto-embryologického studia (Turała-Szybowska, 1978).

U druhu *R. trichophyllus* se lze za určitých ekologických podmínek setkat s kleistogamií. Při kleistogamii probíhá opylení výhradně vlastním pylem uvnitř květu, který se vůbec neotevívá. Dochází k tomu pod vodní hladinou a opylení se uskuteční v plynové bublině, jež vznikne v poupěti. Tento druh dokonce tvoří populace, jež jsou obligátně kleistogamické. Navzdory důležité roli autogamie bývá v květech některých druhů lakušníků vytvořeno poměrně velké množství pylu a nektaru, což by mohlo naznačovat tendenci k cizosprášení (alogamii). Z květů nicméně nebyli zdokumentováni opylovači zaměřující se na sběr pylu nebo nektaru, zato byly pozorovány některé druhy hmyzu, zejména zástupci řádů blanokřídlých, dvoukřídlých a brouků, jež by se na přenosu pylu mohly podílet. Kromě opylení hmyzem (entomogamie) taktéž zřejmě dochází k anemogamii (Cook, 1966a, Hong, 1991, Dahlgren, 1992).

Rozmnožovací strategie se liší v rámci jednotlivých druhů, zároveň ale může být způsob reprodukce výrazně ovlivněn podmínkami prostředí. Rychlost proudu vody může například ovlivnit schopnost rostlin vynořit kvetoucí části nad vodní hladinu, kde by mohly být opyleny. To může v kombinaci s dalšími faktory přispět k tomu, že je v takovém prostředí favorizováným způsobem rozmnožování vegetativní (Pollux et al., 2007). Obecně lze říci, že u druhů s větší velikostí květů je tendence spíše k cizosprášení, naopak u malokvětých druhů převažuje samosprášení (Dahlgren, 1992).

Způsob reprodukce má dopad na genetickou strukturu jednotlivých populací. Vegetativní rozmnožování, díky němuž mohou vznikat rozsáhlé klonální populace, vede k zafixování heterozygoty. Samosprášení, včetně geitonogamie, tzn. opylení pylem z jiného květu téhož jedince, naopak může vést k inbrední depresi. Při tomto jevu dochází k eliminaci

heterozygotů, a proto se ztrácí genetická variabilita. K zajištění genetické variability potom nejvíce přispívá cizosprašení (Schemske & Lande, 1985, Lambertini, 2017).

Semena se rozšiřují pomocí vody (hydrochorie) či jsou přenášena vodními ptáky (zoochorie). Semena mají mnohem větší životnost než vegetativní propagule a u lakušníků, jako u většiny vodních rostlin, dochází k tvorbě semenné banky (Carta et al., 2012). Semenná banka hraje významnou roli zejména při osidlování dočasných stanovišť. Těmi mohou být jak periodicky vysychající stanoviště, tak vodní nádrže, v nichž se mezi sezónami rychle mění kvalita vody. Typickým příkladem takového typu stanovišť jsou hospodářské rybníky, kde se rostliny typicky vyskytují pouze v krátkém období letnění nebo po opětovném napuštění. Semena po zbytek času čekají na obnovu příznivých podmínek v semenné bance. Jednotlivé druhy konzervované v semenné bance mají často odlišné nároky na podmínky růstu, proto mohou drobné změny prostředí vést k meziročním změnám druhové skladby v rámci jednoho stanoviště. Existence semenné banky má proto zásadní vliv na strukturu společenstev, jelikož může být zdrojem genetické diverzity v čase (O'Donnell et al., 2014).

### 3. Charakteristika jednotlivých druhů

#### 3.1. Taxonomické pojetí skupiny

Přístupy k taxonomickému členění sekce *Batrachium* se v různých oblastech značně liší a rovněž se výrazně měnily během historie. Druhové členění založené na kritické revizi celé sekce přinesl až v roce 1966 C. D. K. Cook ve své monografii (Cook, 1966a). Toto řazení je do značné míry přijímáno, avšak s drobnými či většími odchylkami v rámci regionálních flór. V Květeně ČSR (Husák et al., 1988) je například pro lakušníky přijímán rank samostatného rodu. Dále je v této publikaci například druh *R. peltatus* zařazen jen jako varieta druhu *R. aquatilis* (*Batrachium aquatile* var. *peltatum*). Kromě jednoznačného vymezení jednotlivých druhů vyvstává rovněž problém ustanovení taxonomického ranku pro některé taxony. Například zatímco Cook přijímá pro druh *R. penicillatus* tři variety (var. *penicillatus*, var. *calcareus* a var. *vertumnus*), Webster (1988) stejný druh rozděluje do dvou poddruhů (*R. subsp. penicillatus* a *subsp. pseudofluitans*, dále členěný na dvě variety – var. *pseudofluitans* a var. *vertumnus*). Podobně pro populace *R. trichophyllus* z oligotrofních horských jezer, se silnou tendencí ke kleistogamii, uznával ve své monografii C. D. K. Cook (Cook, 1966a) rank poddruhu a klasifikoval je jako *R. trichophyllus* subsp. *lutulentus*. Později byl ovšem tento taxon ve Flora Iberica (Cook et al., 1986) zařazen jako *R. trichophyllus* subsp. *eradicatus* a

některými dalšími autory (např. Englmaier, 2016) je zahrnován jako samostatný druh *R. confervoides*. Problémem je rovněž nejasné vymezení rodičovských taxonů a hybridů v místech sympatrického výskytu druhů, které spolu zároveň hybridizují, či v oblastech výskytu jednoho rodičovského taxonu a jeho hybrida, kdy zároveň dochází ke zpětnému křížení. V takových lokalitách je mnohdy vytvořen plynulý přechod mezi znaky a je nemožné rodičovské taxony a jejich hybridy od sebe odlišit (Rich & Jeremy, 1998). Situaci potom zřejmě nejvíce komplikuje povaha některých tradičně uznávaných taxonů. Například výše zmíněný *R. penicillatus* je dle současných poznatků sběrnou skupinou, která sdružuje primární hybridy, alopolyoidy i linie vzniklé zpětným křížením mezi druhem *R. fluitans* a druhy *R. peltatus*, *R. aquatilis* a *R. trichophyllus* (Cook, 1966a, Zalewska-Gałosz, 2015). Pro nomenklatorické sjednocení je nutná kritická taxonomická revize celé skupiny založená na nových poznatcích získaných s využitím molekulárních metod.

Druhově pojetí je zde sjednoceno podle C. D. K. Cooka (1966a). V práci bude blíže popsáno čtrnáct druhů (viz Tab. 1) s výskytem na území Evropy, která je zřejmě hlavním centrem evoluční diverzity poddruhu.

### 3.2. Morfologické znaky

Morfologické znaky jednotlivých druhů jsou pro lepší přehlednost uvedeny v tabulce (viz Tab. 1). Údaje se vztahují k rostlinám rostoucím ve vodním prostředí, u terestrických forem se podoba jednotlivých znaků může lišit. Zpracováno dle Cook, 1966a, Rich & Jeremy, 1998, Englmaier, 2016, a Prančl & Kaplan, 2017.

**Tab. 1 – Morfologická charakteristika jednotlivých druhů.**

	<i>R. aquatilis</i> L.	<i>R. baudotii</i> Godr.
<b>typ listů</b>	niťovité i lupenité, lupenité listy se vytvářejí pouze někdy	niťovité i lupenité, lupenité listy za květu častěji chybějí
<b>niťovité listy</b>	zpravidla kratší než příslušný lodyžní článek, řapík do 25 mm dlouhý	řapík 5–20 mm dlouhý, úkrojky pevné
<b>lupenité listy</b>	řapík dlouhý do 90 mm, čepel široká do 30 mm, ledvinitá až okrouhlá, členěná obvykle alespoň do 2/3 délky na (3–) 5 (–7) úkrojků, úkrojky široce klínovité, na okraji zubaté	řapík až 80 mm dlouhý, čepel široká do 30 mm, ledvinitá až okrouhlá, na bázi často uťatá, hluboce členěná alespoň ze 2/3 délky na 3, výjimečně 5 úkrojků, úkrojky vroubkované až zubaté
<b>palisty</b>	trojúhelníkovité, přirostlé k řapíku alespoň ze 3/4 jejich délky	téměř okrouhlé, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku zhruba z 1/2 jejich délky
<b>květní lůžko</b>	hustě chlupaté, za plodu kulovité	hustě chlupaté, za plodu prodloužené
<b>plodní stopky</b>	jen vzácně delší než 50 mm, kratší než řapík příslušného lupenitého listu	30–90 mm dlouhé, delší než řapík příslušného lupenitého listu, často silně nazpět ohnuté
<b>nažky</b>	v počtu (21–) 32–36 (–49), nezralé jsou chlupaté, zralé mohou olysávat	v počtu (16–) 33–39 (–60), lysé, ve zralosti s úzkým křídlatým lemem
<b>val kolem jamky nektária</b>	okrouhlý	poloměsíčitý, okrouhlý či hruškovitý
<b>kališní lístky</b>	3–5 mm dlouhé, opadavé	2,5–4,5 mm dlouhé
<b>korunní lístky</b>	5–10 mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla překrývající se během kvetení	5,5–10 mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla se během kvetení překrývají



	<i>R. circinatus</i> Sibth.	<i>R. fluitans</i> Lam.	<i>R. hederaceus</i> L.	<i>R. ololeucos</i> J. Lloyd
<b>typ listů</b>	pouze niťovité	pouze niťovité	pouze lupenité	niťovité i lupenité
<b>niťovité listy</b>	řapík 2–5 (–10) mm dlouhý, úkrojky na průřezu okrouhlé až půlkruhovitě, krátké a tuhé <sup>1</sup> , rozestálé, i po vytažení z vody vějířovitě ležící v jedné rovině	list delší než příslušný lodyžní článek, řapík dlouhý do 22 cm, čepel dlouhá do 25 cm, malý počet dlouhých, velmi pevných úkrojků zřídka více než 4x větvených	chybějí	vzácně mohou chybět, řapík 1–40 mm dlouhý, čepel dlouhá 10 – 50 mm, úkrojky jemné, měkké, v terestrické formě zploštělé a tuhé
<b>lupenité listy</b>	chybějí	chybějí	řapík 2–4x delší než listová čepel, čepel dlouhá 4–25 mm, 3–35 mm široká, tvaru ledvinitého až srdčitého, 3–5–, vzácně i 7 laločná, úkrojky jsou nejširší na bázi, celokrajné až vroubkované	řapík (20) 40–60 (100) mm dlouhý, čepel často výrazně načervenalá, široká do 30 mm, ledvinitá až okrouhlá, hluboce členěná na 3 až vzácně 5 úkrojků, úkrojky klínovité, celokrajné nebo vroubkované
<b>palisty</b>	vejčité, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku alespoň ze 3/4 jejich délky	eliptické až vejčité, přirostlé k řapíku ze 3/4 jejich délky nebo více	vejčité s ostrým zakončením, srostlé s řapíkem z více než 1/2 jejich délky	Okrouhlé, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku z více než 2/3 jejich délky
<b>květní lůžko</b>	chlupaté	téměř lysé až lysé	lysé	chlupaté
<b>plodní stopky</b>	20–100 mm dlouhé	4–10 cm dlouhé	přibližně stejně dlouhé jako řapík příslušného lupenitého listu	stejně dlouhé nebo mírně delší než řapík příslušného lupenitého listu
<b>nažky</b>	v počtu (30–) 42–48 (–56), nezralé chlupaté, za zralosti mohou být olysalé	v počtu 34–63, nezralé řídce chlupaté, zralé často olysalé, na našem území nažky tvoří velmi vzácně	v počtu (15–) 20–50 (–67), lysé	v počtu 16–30, lysé
<b>val kolem jamky nektária</b>	poloměsíčitý (méně často okrouhlý)	hruškovitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý
<b>kališní lístky</b>	zřídka delší než 6 mm	4–6,5 mm dlouhé	(1–) 2–2,5 (–3) mm dlouhé	3,5–4,5 mm dlouhé
<b>korunní lístky</b>	6–12 mm dlouhé, obvejčité, zpravidla překrývající se během kvetení	v počtu 5–13, 7–13 mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla se během kvetení překrývají	(1,25) 2,5–3,5 (4,25) mm dlouhé, vejčité, zpravidla se během kvetení nepřekrývají	7–15 mm dlouhé, vejčité až obvejčité, u některých populací celé bílé

<sup>1</sup> Tuhé úkrojky lze najít i u jiných druhů lakušníků, pokud jsou listy inkrustovány uhličitany. K tomu dochází poměrně často v minerálně bohatých vodách a takové rostliny bývají proto za *R. circinatus* někdy zaměňovány.

	<i>R. omiophyllus</i> Ten.	<i>R. peltatus</i> Schrank	<i>R. penicillatus</i> (Dumort.) Bab.	<i>R. rionii</i> Lager
<b>typ listů</b>	pouze lupenité	niťovité i lupenité, lupenité listy vytváří za květu téměř vždy	niťovité i lupenité, některé populace stabilně vytváří pouze niťovité listy	pouze niťovité
<b>niťovité listy</b>	chybějí	zpravidla kratší než příslušný lodyžní článek, řapík 5–25 mm dlouhý, úkrojky po vytažení z vody obvykle nedrží tvar	dlouhé 5–20 cm, zpravidla stejně dlouhé nebo delší než příslušný lodyžní článek, úkrojky 4–8x větvené, měkké	řapík dlouhý do 20 mm, úkrojky polotuhé
<b>lupenité listy</b>	řapík 3–6x delší než listová čepel, čepel dlouhá 2–26 mm, 3–32 mm široká, ledvinitého až zaokrouhleného tvaru, 3–5– nebo vzácně 7laločná, úkrojky jsou na bázi nejužší, na okraji vroubkované	řapík zřídka přesahuje délku 70 mm, čepel je do 40 mm široká, ledvinitá až okrouhlá, členěná do méně než 2/3 délky, na většinou 3–7 úkrojků, úkrojky široce klínovité se zubatým okrajem	řapík 50–80 mm dlouhý, čepel do 40 mm široká, ledvinitá až okrouhlá, na bázi klínovitá, do 2/3 nebo méně délky členěná na 3 nebo 5 úkrojků, úkrojky jsou klínovité, celokrajné až zubaté	chybějí
<b>palisty</b>	Vejšitité, na vrcholu tupě zaokrouhlené, srostlé s řapíkem maximálně do 1/2 jejich délky	eliptické až trojúhelníkovité, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku alespoň ze 3/4 jejich délky	okrouhlé až vejčité, přirostlé k řapíku alespoň ze 3/4 jejich délky	vejčité až okrouhlé, přirostlé k řapíku zhruba ze 2/3 jejich délky
<b>květní lůžko</b>	lysé	chlupaté, za plodu ± kulovité	hustě chlupaté, za plodu ± kulovité	chlupaté, za plodu prodloužené
<b>plodní stopky</b>	stejně dlouhé nebo kratší než řapík příslušného lupenitého listu	28–190 mm dlouhé, nad 100 mm spíše ojediněle, delší než řapík příslušného lupenitého listu	50–100 mm dlouhé, většinou delší než řapík příslušného lupenitého listu	30–50 mm dlouhé
<b>nažky</b>	v počtu (15–) 20–50 (–67), lysé	v počtu (25–) 30–40 (–80), nezralé jsou chlupaté, za zralosti mohou být olysalé	v počtu (15–) 50–80, chlupaté	v počtu 25–70 (–100), 0,8–1,3 mm dlouhé, lysé
<b>val kolem jamky nektária</b>	poloměsíčitý	hruškovitý	hruškovitý	poloměsíčitý, zřídka hruškovitý
<b>kališní lístky</b>	(1,75–) 2,5–3 (–3,75) mm dlouhé, nazpět ohnuté	3–6 mm dlouhé, opadavé	3–7 mm dlouhé	2–2,5 mm dlouhé
<b>korunní lístky</b>	(3,75) 2,5–3 (3,75) mm dlouhé, vejčité, zpravidla se během kvetení nepřekrývají	12–15 (–21) mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla překrývající se během kvetení	(5–) 10–15 (–20) mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla překrývající se během kvetení	3,5–5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité

	<i>R. saniculifolius</i> Viv.	<i>R. sphaerospermus</i> Boiss. & Blanche	<i>R. trichophyllus</i> Chaix	<i>R. tripartitus</i> DC.
<b>typ listů</b>	niťovité i lupenité, lupenité listy se za květu objevují vždy	pouze niťovité	pouze niťovité	niťovité i lupenité
<b>niťovité listy</b>	na spodních částech lodyhy, případně mohou i chybět, řapík 5–20 mm dlouhý, úkrojky jemné, měkké	řapík do 20 mm dlouhý, úkrojky polotuhé	řapík dlouhý do 40 mm	na spodnějších částech rostliny nebo chybějí, řapík 1–10 mm dlouhý, čepel dlouhá 10–40 mm, úkrojky jsou velmi jemné, měkké
<b>lupenité listy</b>	řapík do 40 mm délky, čepel do 12 mm široká, ledvinitá až okrouhlá, hluboce členěná na 3(–5) úkrojků, úkrojky klínovité celokrajné nebo vroubkované	chybějí	chybějí	řapík (10) 20–30 (70) mm dlouhý, čepel široká do 40 mm, ledvinitá až okrouhlá, hluboce členěná v 3, vzácně 5 úkrojků, úkrojky jsou klínovitého tvaru, celokrajné nebo vroubkované
<b>palisty</b>	okrouhlé, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku z více než 2/3 jejich délky	eliptické až trojúhelníkovité, přirostlé k řapíku alespoň z 1/2 jejich délky	eliptické až vejčité, přirostlé k řapíku alespoň ze 2/3 jejich délky	okrouhlé, na vrcholu tupě zaokrouhlené, přirostlé k řapíku z více než 2/3 jejich délky
<b>květní lůžko</b>	lysé	chlupaté, za plodu prodloužené	chlupaté, za plodu ± kulovité	chlupaté
<b>plodní stopky</b>	± stejně dlouhé jako řapík příslušného lupenitého listu	(30–) 50–60 (–80) mm dlouhé	11–48 mm dlouhé	stejně dlouhé nebo mírně kratší než řapík příslušného lupenitého listu
<b>nažky</b>	v počtu 2–6, 2,5 mm dlouhé, lysé	v počtu 50–80, méně než 1 mm dlouhé, ± kulovité, lysé nebo řídce chlupaté	v počtu 10–50, nezralé chlupaté, za zralosti mohou být olýsalé	v počtu 4–27, lysé
<b>val kolem jamky nektária</b>	poloměsíčitý	hruškovitý	poloměsíčitý	poloměsíčitý
<b>kališní lístky</b>	2–3 mm dlouhé, opadavé	3–6 mm dlouhé, opadavé	2,5–3,5 mm dlouhé, opadavé	1–3 mm dlouhé, na zpět ohnuté, opadavé
<b>korunní lístky</b>	4–6 mm dlouhé, vejčité až obvejčité	9–25 (–30) mm dlouhé, široce obvejčité, zpravidla překrývající se během kvetení	2–7,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité	1,25–5,5 mm dlouhé, vejčité až obvejčité

### 3.3. Ekologie a rozšíření

Lakušníky osidlují různé typy vodního prostředí. Můžeme je najít od rychle tekoucích vod po stojaté, od oligotrofních po eutrofní stanoviště. S velkou oblibou vyhledávají stanoviště s kolísajícím sloupcem. Tam mohou v terestrické formě vytvářet porosty i na bahnitých substrátech břehů a obnažených den. Nároky jednotlivých druhů na chemismus vody se značně liší, druh *R. baudotii* například toleruje určitou míru salinity a roste i v pobřežních oblastech v brakických vodách (Cook, 1966a). Rozdílný chemismus vody na různých lokalitách je považován za hlavní faktor ovlivňující rozšíření jednotlivých druhů sekce (Lumbreras, 2009).

Areál výskytu je poměrně rozsáhlý, pokrývá oblasti mírného pásu severní polokoule, oblasti Jižní Ameriky, jih Afriky, jihovýchod Austrálie, Tasmánie a Nový Zéland. Za centrum druhové a morfologické diverzity je považována atlantská a středozevní Evropa (Cook, 1963, Cook, 1966a). Na území Evropy se dle C. D. K. Cooka nalézají čtrnáct z celkového počtu asi dvaceti pěti druhů, které jsou nyní známy. Ve střední Evropě včetně České republiky potom můžeme najít druhů osm (Kaplan, 2002).

Na území České republiky je problémem intenzivní hospodaření na rybnících, v jehož důsledku některé druhy ustupují. Množství lokalit rovněž zaniklo v 70. a 80. letech 20. století v souvislosti s regulací vodních toků a destrukcí mokřadů. Pro zhodnocení stupně ohrožení je rovněž nutno vzít v potaz vliv taxonomického pojetí, které se v různých zemích liší. V důsledku toho nejsou některé druhy v daných oblastech rozlišovány, a tím pádem není známo ani jejich přesné rozšíření.

Údaje o ekologii a rozšíření jednotlivých druhů jsou zpracovány dle Cook, 1966a, Wolff & Schwarzer, 1991, Rich & Jeremy, 1998, Englmaier, 2016, Práněl & Kaplan, 2017 (viz Tab. 2). Zároveň je nutno zmínit, že údaje o rozšíření mohou podléhat chybovosti způsobené nesprávným určením a tím, že druhové pojetí není ve všech oblastech sjednocené (Englmaier, 2016).

**Tab. 1 – Ekologie a rozšíření jednotlivých druhů**

druh	ekologie	rozšíření
<i>R. aquatilis</i>	často dočasné nádrže nebo nádrže s klesajícím vodním sloupcem do hloubky až 2 m, přirozeně eutrofní až mezotrofní vody, i terestricky na obnažených dnech	celá Evropa vyjma nejsevernějších oblastí, severní Afrika, Mongolsko, severovýchodní Čína a Japonsko, pacifické pobřeží S a J Ameriky
<i>R. baudotii</i>	v přímořských oblastech zejména brakické vody, periodické nádrže a nížinné řeky, ve vnitrozemí v minerálně bohatých tvrdých vodách	přímořské oblasti Evropy do 65° s. š., severozápadní Afrika, z vnitrozemských států Rakousko, Maďarsko, Slovensko, Česká republika; na našem území vzácně, zejména oblast Podbořanska a Polabí, dále jižní Morava
<i>R. circinatus</i>	ve stojatých nebo vzácněji v tekoucích vodách, rybníky, tůně, odvodňovací kanály, až do 5 m hloubky, terestrickou formu tvoří zřídka	severozápadní a střední Evropa, severní Asie; na našem území roztroušeně v nižších polohách, v teplejších oblastech
<i>R. fluitans</i>	rychleji tekoucí vody, na neutrálním až kyselém podkladu, se šterkovitým dnem	západní a střední Evropa; na našem území roztroušeně v nižších polohách, na Moravě vzácně, na severní a střední Moravě a na Slovensku chybí
<i>R. hederaceus</i>	drobnější toky, příkopy, rybníky, často dočasná stanoviště, terestricky na vlhkých substrátech, také disturbovaná stanoviště	Severní Amerika, Evropa, v rámci Evropy atlantský charakter rozšíření, hojně na Britských ostrovech
<i>R. oroleucos</i>	oligotrofní vody, podobně jako <i>R. tripartitus</i>	západní Evropa od Portugalska po Nizozemsko, chybí na Britských ostrovech
<i>R. omiophyllus</i>	drobnější toky, příkopy, rybníky, často dočasná stanoviště, terestricky na vlhkých substrátech, také disturbovaná stanoviště	Evropa, severní Afrika, v Evropě atlantský charakter rozšíření: zejména Portugalsko, sever Francie a Britské ostrovy
<i>R. peltatus</i>	tekoucí i stojaté vody, obnažená dna, řeky, tůně, rybníky	po celé Evropě vyjma nejsevernějších oblastí, v pobřežních regionech severní Afriky; v České republice roztroušeně až dosti hojně od pahorkatin až po horské oblasti, v nížinách vzácně
<i>R. penicillatus</i>	tekoucí vody, řeky, kanály, podobně jako <i>R. fluitans</i> , oproti němu preferuje i jemnozrnější substráty	po celé Evropě vyjma nejsevernějších oblastí a Balkánského poloostrova; na našem území vzácně v Čechách a severní Moravě

druh	ekologie	rozšíření
<i>R. rionii</i>	mělké, stojaté minerálně bohaté eutrofní vody, často dočasné nádrže	v Evropě od Rýna dále na východ, v Asii až po Čínu, Korej, Japonsko, dále v Jihoafrické republice; na našem území vzácně až roztroušeně v teplejších oblastech jižní a střední Moravy a severní poloviny Čech
<i>R. saniculifolius</i>	brakické i sladké vody přímořských oblastí, zřídka dále než 15 km od hranice moře	pobřežní oblasti Mediteránu
<i>R. sphaerospermus</i>	dočasné nádrže nebo nádrže s klesajícím vodním sloupcem, podobné ekologické nároky jako <i>R. rionii</i>	od východního Řecka přes Malou Asii až po Kašmír a Nepálu, alopatricky s <i>R. peltatus</i>
<i>R. trichophyllus</i>	eutrofní i oligotrofní, stojaté nebo pomalu tekoucí vody, rybníky, tůňe, dočasné nádrže, obnažená dna	široce rozšířený, celá Evropa vyjma nejsevernějších oblastí, severní Asie, severovýchodní Čína a Japonsko, jihovýchodní Austrálie, Tasmánie, Severní Amerika
<i>R. tripartitus</i>	stanoviště chudé na vápník, příkopy, dočasné nádrže, rašelinné tůňky	Evropa, atlantský charakter rozšíření: zejména Portugalsko, Francie, Britské ostrovy

Na území České republiky se vyskytuje osm z výše zmíněných druhů (Kaplan, 2002). Sedm z nich je zahrnuto v Červeném seznamu České republiky. Prvním taxonem je *R. baudotii* jakožto kriticky ohrožený druh (C1b), dále pak taxony *R. rionii* a *R. penicillatus* jakožto silně ohrožené druhy (C2b, C2r), *R. circinatus* jakožto ohrožený druh (C3), *R. fluitans* a *R. trichophyllus* jakožto vzácnější taxony vyžadující pozornost – méně ohrožené (C4a) a *R. aquatilis* jakožto vzácnější taxon vyžadující pozornost – nedostatečně prostudovaný (C4b) (Grulich, 2012).

### 3.4. Karyologie

Základní chromozomové číslo sekce *Batrachium* je  $n=8$ . Můžeme zde celkem najít pět stupňů ploidie, a to od diploidního počtu až po hexaploidní (Cook, 1962, Cook 1966a). Chromozomy většiny druhů dosahují dvou až pěti mikrometrů, spadají tedy do kategorie malých až středně velkých, u druhů *R. penicillatus* a *R. sphaerospermus* byly ovšem zdokumentovány chromozomy až v délce osmi mikrometrů (Dahlgren, 1991). Podle polohy centromery byly u lakušníků zaznamenány chromozomy tří kategorií, a to metacentrické až submetacentrické, akrocentrické a téměř telocentrické (Cook, 1966a). Mezi jednotlivými druhy se zároveň nalézají drobné rozdíly mezi tvarem a velikostí chromozomů, které by zřejmě mohly mít taxonomickou hodnotu (Dahlgren, 1991).

Chromozomové počty uváděné pro jednotlivé druhy jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 3).

**Tab. 3 – Chromozomové počty jednotlivých druhů**

druh	2n	ploidie	oblast	zdroj
<i>R. aquatilis</i>	32	4x	Dánsko, Česká republika	Dahlgren, 1993, Měsíček & Jarolímová, 1992
	48	6x	Anglie, Německo, Polsko	Cook, 1962, Turała, 1969
<i>R. baudotii</i>	16	2x	Španělsko	Diosdado et al., 1993
	32	4x	Anglie, Rakousko, Finsko, Egejské ostrovy, Česká republika, Švédsko, Polsko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991, Dvořák & Dadáková, 1984, Hong, 1991, Turała, 1969, Polsko
<i>R. circinatus</i>	16	2x	Anglie, Německo, Dánsko, Česká republika, Polsko, Švédsko	Cook, 1962, Dahlgren, 1993, Hong 1991, Měsíček & Jarolímová, 1992, Turała, 1969
<i>R. fluitans</i>	16	2x	Anglie, Německo, Česká republika, Švédsko	Cook, 1962, Hong, 1991, Měsíček & Jarolímová, 1992, Turała, 1977
	24	3x	Německo, Česká republika	Cook, 1962, Měsíček & Jarolímová, 1992, Turała, 1977
	32	4x	Anglie, Německo, Česká republika	Cook, 1962, Turała, 1977
<i>R. hederaceus</i>	16	2x	Britské ostrovy, Portugalsko	Cook, 1962
<i>R. ololeucos</i>	16	2x	Nizozemsko, Španělsko	Cook, 1962, Diosdado et al., 1993
	32	4x	Španělsko	Diosdado et al., 1993
<i>R. omiophyllus</i>	16	2x	Sicílie	Cook, 1962
	32	4x	Anglie	Cook, 1962
<i>R. peltatus</i>	16	2x	Portugalsko, Španělsko	Cook, 1966a, Diosdado et al., 1993
	32	4x	Dánsko, Německo, Španělsko, Polsko	Cook, 1962, Dahlgren 1993, Diosdado et al., 1993, Turała, 1969
	48	6x	Anglie	Cook, 1966a
<i>R. penicillatus</i>	16	2x	Řecko, Turecko, Španělsko	Dahlgren, 1991, Diosdado et al., 1993
	24	3x	Dánsko	Dahlgren, 1993
	32	4x	Německo, Dánsko, Španělsko, Polsko	Cook, 1962, Dahlgren, 1993, Diosdado et al., 1993, Turała, 1970, Turała-Szybowska, 1978
	48	6x	Anglie, Německo	Cook, 1966a
<i>R. rionii</i>	16	2x	Rakousko, Irák, Turecko, Řecko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991
<i>R. saniculifolius</i>	16	2x	Kypr	Cook, 1966a
<i>R. sphaerospermus</i>	16	2x	Irák, Turecko, Řecko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991

druh	2n	ploidie	oblast	zdroj
<i>R. trichophyllus</i>	16	2x	Egejské ostrovy, Španělsko	Dahlgren, 1991, Diosdado et al., 1993
	32	4x	Anglie, Německo, Egejské ostrovy, Mongolsko, Polsko	Cook, 1962, Dahlgren, 1991, Měsíček & Soják, 1995, Turata, 1969
	40	5x	Egejské ostrovy	Dahlgren, 1991
	48	6x	Egejské ostrovy, Česká republika, Polsko	Dahlgren, 1991, Měsíček & Jarolímová, 1992, Turata, 1969
<i>R. tripartitus</i>	32	4x	Španělsko	Diosdado et al., 1993
	48	6x	Anglie, Egejské ostrovy	Cook, 1962, Dahlgren, 1991

## 4. Mikroevoluční procesy jako zdroj variability

Mikroevoluce jako evoluce na úrovni druhů a populací spočívá ve změně frekvence alel genů a je způsobována procesy mutace, selekce, genového toku a genetického driftu. Mikroevoluční změny v delším časovém měřítku mohou mít za následek vznik nových druhů – specií. Specie se projevuje buď jako pozvolná, způsobená dlouhodobým hromaděním změn, nebo jako saltační (skoková), kdy nové druhy vznikají prakticky okamžitě. Saltační speciace je často zároveň specií sympatrickou. To znamená, že k vzniku nového druhu dochází v místě výskytu druhu rodičovského (Ridley, 2004). Procesy, jež umožňují saltační speciaci, jsou hlavně polyploidizace a hybridizace, které hrají zásadní roli i v evoluci sekce *Batrachium*.

### 4.1. Polyploidizace

Polyploidizace je proces, při němž dochází ke znásobení sad chromozomů a tedy k multiplikaci genomu (Briggs & Walters, 2001). Tento proces může vést k okamžitému vzniku reprodukční bariéry mezi polyploidem a rodičovským taxonem a tím pádem i k sympatrické specií (Otto & Whitton, 2000, Rieseberg & Willis, 2007). Polyploidizace je zásadním faktorem utvářejícím diverzitu cévnatých rostlin (Soltis et al., 2009). Genomovou duplikací prošly zřejmě v minulosti všechny krytosemenné rostliny včetně nejbazálnější krytosemenné rostliny *Amborella trichopoda* (Albert et al., 2013). Některé z rostlin se poté vrátily k počtu dvou chromozomových sádek procesem diploidizace (Soltis et al., 2015).

Polyploidizaci lze dále rozdělit na autopolyploidizaci a alopolyplodizaci. Při autopolyploidizaci dochází ke znásobení chromozomové sady v rámci jednoho taxonu. To může probíhat narušením buněčného dělení po mitóze, nebo splynutím dvou neredukovaných gamet jedinců jednoho druhu, ale nejčastěji polyploidie vznikají přes tzv. triploidní most



(triploid bridge). Ke vzniku triploida dochází, pokud splyne neredukovaná ( $2n$ ) a redukovaná ( $n$ ) gameta od diploidního organismu. Splynutím neredukované gamety triploida ( $3n$ ) a redukované gamety diploida ( $n$ ) pak vzniká stabilní tetraploid ( $4n$ ) (Briggs & Walters, 2001, Mason & Pires, 2015). Alopolyloidizace je potom zmnožení chromozomové sádky u mezidruhových hybridů (Briggs & Walters, 2001). Autopolypleidi často nejsou rozlišováni od svého rodičovského taxonu, jelikož na rozdíl od alopolypleidů nekombinují morfologické znaky více druhů, a tudíž jsou často podobní svému jedinému rodiči (Soltis et al., 2007). Přestože oba typy polypleidizace dokáží způsobit vznik nových druhů, zdá se, že jevem, který k tomu vede častěji, je alopolypleidizace (Soltis & Soltis, 2009). Polypleidie je u lakušníků častá a nalézáme ji napříč jednotlivými taxony (viz Tab. 3). Přičemž pravděpodobným autopolypleidem je zde například triploidní *R. fluitans* (Turała-Szybowska, 1977) a alopolypleidem zřejmě hexaploidní *R. aquatilis* (Hong, 1991).

C. D. K. Cook ve své studii srovnává vlastnosti přirozených i pomocí kolchicinu indukovaných tetraploidů s diploidy u druhů *R. hederaceus* a *R. omiophyllus*. Podle jeho výsledků měli za jednotných podmínek tetraploidi větší velikost průduchů, větší průměr pylových zrn, ale menší počet zrn typicky utvářených, z čehož autor vyvozoval menší procento samčí fertility. Při změně podmínek však nebylo možné na základě těchto charakteristik diploidy a tetraploidy rozlišit (Cook, 1966b).

Polypleidizace hraje velkou roli u mezidruhových hybridů, u nichž se díky ní může obnovit plodnost a tímto způsobem nezřídka dochází ke vzniku stabilizovaných hybridogenních taxonů. Příkladem mohou být polypleidní linie druhu *R. penicillatus* (viz kapitolu 3.1.; Cook, 1966a, Webster, 1988).

Dle výsledků autorky Gertrud Dahlgrenové se v mediteránních oblastech vyskytuje mnohem více diploidních linií než ve zbytku areálu. Je proto otázkou, zda je pravděpodobnějším místem vzniku sekce oblast západní Evropy, kde je nalézán nejvyšší počet druhů a největší variabilita, nebo oblast, kde dominují diploidní taxony, jež se mohly dále šířit a dát následně vzniknout polypleidům (Dahlgren, 1995).

## 4.2. Hybridizace

Pojmem hybridizace označujeme mezidruhové křížení, ke kterému dochází v místě sympatrického výskytu dvou různých taxonů, tedy v takzvané hybridní zóně. Vzniklé hybridy mohou mít odlišné spektrum vlastností než rodiče, často jsou v daném prostředí i úspěšnější, nebo naopak dokáží osidlovat nové niky (Cook, 1970, Les & Philbrick, 1993, Wisseman,

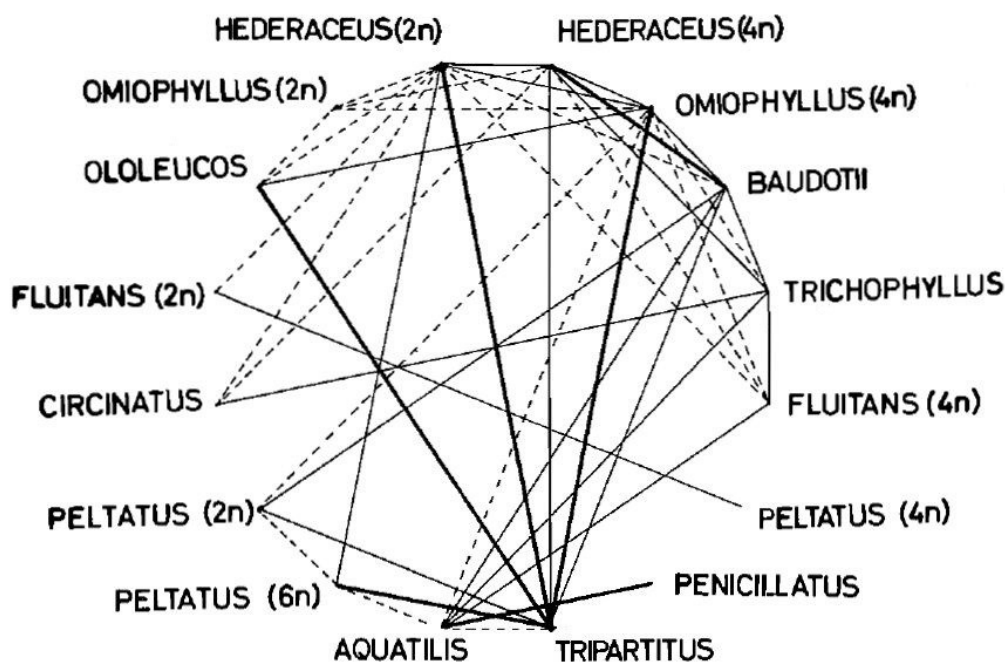
2007). Ve vodním prostředí umožňuje styk jinak ekologicky oddělených druhů zejména periodické kolísání vodní hladiny. To se zároveň díky disturbanci podílí na tvorbě nových nik, jež jsou nově vzniklým hybridům dostupné pro kolonizaci (Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Hybridizaci lze označit jako homoploidní, má-li nově vzniklý kříženec stejnou ploidii jako oba rodičovské taxony. Pokud mají rodičovské taxony odlišnou ploidii, hovoříme o hybridizaci heteroploidní (Briggs & Walters, 2001). U hybridů je častá snížená fertilita nebo úplná sterilita zapříčiněná potížemi s párováním chromozomů při meióze. Tento problém může být však vyřešen spontánním zmnožením chromozomové sádky (Hegarty & Hiscock, 2008).

Místa výskytu rodičovských druhů a jejich primárních i zpětných hybridů označujeme termínem hybridní roje. V takovýchto oblastech nalézáme plynulý přechod mezi znaky obou rodičovských druhů, což znesnadňuje či dokonce znemožňuje rozlišení jednotlivých taxonů (Harrison, 1993). Zároveň nezávislé hybridizační události v některých případech vedou ke vzniku podobných fenokopií, tedy jedinců s podobným fenotypovým projevem. Takovýto evoluční paralelismus přispívá rovněž k existenci kryptické diverzity (Les & Philbrick, 1993, Kaplan & Fehrer, 2011).

Hybridizace je u lakušníků velice častá, a to i mezi různými ploidními úrovněmi. U primárních hybridů je zpravidla značně snížená plodnost, nebo jsou tyto kříženci zcela sterilní. Míra fertility hybridů zřejmě rovněž souvisí s počtem chromozomových sad. Diploidní hybridi jsou nejčastěji sterilní či zcela neživotaschopní, tetraploidní hybridi a stejně tak i někteří pentaploidi mohou být sterilní či fertilní, hexaploidní hybridi jsou většinou alespoň částečně fertilní (Cook, 1970).

V monografii C. D. K. Cooka jsou uvedeny příklady experimentální hybridizace, v rámci níž byly navzájem kříženy i druhy se značně rozlišnými ekologickými nároky, které se v přírodě nepotkávají (viz Obr. 5.). Výsledek jednatřiceti mezidruhových kombinací sestával z patnácti opakovaných neúspěšných křížení a šestnácti životaschopných hybridů. Produktem úspěšných experimentů bylo jak sterilní, tak částečně fertilní potomstvo (Cook, 1966a). Různými autory byla rovněž zdokumentována řada přirozeně se vyskytujících hybridů (viz Tab. 4). Na našem území je nejčastějším hybridem *R. peltatus* × *R. trichophyllus* (Prančl & Kaplan, 2017), ačkoli Cook (1966a) ve své monografii udává, že se spolu tyto dva druhy nekříží.



Obr. 5 – Diagram experimentálního křížení lakušníků. Silné čáry představují fertilní hybridy, slabé čáry sterilní hybridy a přerušované čáry neúspěšná křížení. Přejato (Cook, 1966a).

Tab. 4 – Přehled zdokumentovaných přirozených hybridů

hybrid	zdroj
<i>R. omiophyllus</i> × <i>R. tripartitus</i> [ <i>R. x novae-forestae</i> S.D. Webster]	Rich & Jeremy, 1998
<i>R. omiophyllus</i> × <i>R. peltatus</i> [ <i>R. x hiltonii</i> H. Groves et J. Groves]	Cook, 1966a
<i>R. tripartitus</i> × <i>R. ololeucos</i> [ <i>R. x felixii</i> Segret]	Cook, 1966a
<i>R. fluitans</i> × <i>R. peltatus</i> [ <i>R. x kelchoensis</i> S.D. Webster]	Cook, 1966a, Rich & Jeremy, 1998, Zalewska-Gałosz et al., 2015
<i>R. baudotii</i> × <i>R. aquatilis</i> [ <i>R. x lamberti</i> A. Félix]	Cook, 1966a
<i>R. baudotii</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x segretii</i> A. Félix in schaed.]	Cook, 1966a
<i>R. fluitans</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x bachii</i> Wirtgen]	Cook, 1966a, Englmaier, 2016, Rich & Jeremy, 1998
<i>R. trichophyllus</i> × <i>R. circinatus</i> [ <i>R. x gluckii</i> A. Félix in schaed.]	Cook, 1966a, Englmaier, 2016
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. trichophyllus</i> [ <i>R. x lutzii</i> A. Félix]	Cook, 1966a, Prančl & Kaplan, 2017, Turała & Wołek, 1971
<i>R. peltatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl & Kaplan, 2017
<i>R. fluitans</i> × <i>R. aquatilis</i>	Cook, 1966a
<i>R. aquatilis</i> × <i>R. peltatus</i>	Prančl & Kaplan, 2017
<i>R. peltatus</i> × <i>R. penicillatus</i>	Prančl & Kaplan, 2017
<i>R. circinatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., unpubl.
<i>R. penicillatus</i> × <i>R. trichophyllus</i>	Prančl et al., unpubl.

To, jakým směrem probíhá hybridizace i případná introgrese je zřejmě ovlivněno množstvím pylu, který rostliny produkují. Často jsou donory pylu druhy s velkými květy a jeho akceptory druhy s malými květy. Pokud dále probíhá zpětné křížení s jedním rodičovským taxonem, může docházet k jednosměrnému toku genů. Evolučním fenoménem, jenž se s takovýmto jednosměrným transferem pylu pojí, je tzv. *chloroplast capture* (Rieseberg & Soltis, 1991). Jelikož u krytosemenných rostlin je chloroplastová DNA děděná až na výjimky maternálně, tak po několika generacích při opakovaném zpětném křížení samičího hybridu se samčím rodičovským taxonem nalézáme jedince s jadernou DNA typu otcovského rodičovského taxonu a chloroplastovou DNA druhého taxonu (Rieseberg & Soltis, 1991). Jako příklad lze uvést křížení druhů *R. trichophyllus* a *R. peltatus*. Velkokvětý druh *R. peltatus* je zde donorem pylu a malokvětý *R. trichophyllus* akceptorem, o čemž svědčí nalezení jedinci, u nichž byla zdokumentována velikost genomu odpovídající druhu *R. peltatus*, ale jejich chloroplastová DNA odpovídala typu *R. trichophyllus* (Prančl et al., unpubl.).

K udržení vzniklých hybridů v přírodě přispívá schopnost lakušníků šířit se klonálně. Touto schopností udržet se vegetativní cestou a případně dokonce přežít i vlastní rodičovské taxony disponují i jiné vodní rostliny. Jmenovat lze například rod *Potamogeton*, u něhož je mezidruhová hybridizace intenzivně zkoumána (Preston et al., 1998. Kaplan et al., 2009).

Díky tomu, že mezidruhovým křížením mohou vznikat i částečně fertillní hybridogenní typy, které se dále šíří, se v této skupině setkáváme například s tradičně uznávaným druhem *R. penicillatus*, který je ve skutečnosti polyfyletickým agregátem (viz kapitolu 3.1.; Wiegand & Herr, 1983, Zalewska-Gałosz et al., 2015). Další hybridogenní skupina, objevená v oblasti Fennoskandinávie, jež zahrnuje rovněž různé evoluční linie vzniklé křížením několika rodičovských taxonů, byla nedávno poněkud kontroverzně popsána jako nový druh *R. schmalhauseni* (Bobrov et al., 2015).

## 5. Navazující diplomová práce

Z recentních studií využívajících molekulární metody vyplývá existence kryptické variability v rámci této komplikované skupiny a je zřejmá existence většího počtu taxonů, než je v současné době rozeznáváno (Bobrov et al., 2015, Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Ve své navazující diplomové práci bych se v rámci tohoto tématu chtěla věnovat problematice kryptického komplexu *Ranunculus trichophyllus* agg. v Evropě, u něhož se

uplatňuje celá řada evolučních procesů. Jedná se o skupinu morfologicky redukovaných, homofylních lakušníků, u nichž je známá ploidní variabilita. Rostou v širokém spektru biotopů od nížin po hory, přičemž některé populace mají poměrně specifické ekologické nároky. Tyto populace jsou některými autory vymezovány jako druh *R. confervoides*. Tento taxon má arкто-alpínské rozšíření a v alpské oblasti osidluje vysokohorská jezera, tedy prostředí unikátní svou izolovaností, kde pravděpodobně dochází jen k omezenému toku genů (Englmaier, 2016).

Jsou zde zdokumentovány čtyři ploidní úrovně, jež se zřejmě liší svým rozšířením (viz kapitulu 3.4.). V severní Evropě se vyskytuje *R. trichophyllus* jako hexaploid, který se kříží s rovněž hexaploidním typem druhu *R. aquatilis*. Tak se vytvářejí hybridní roje, kde není možné vymezit hranice jednotlivých taxonů (Hong, 1991). Populace ze střední Evropy jsou hlavně tetraploidní. Jelikož byl však z tohoto území zdokumentován i hexaploidní cytotyp (Měsíček & Jarolímová, 1992, Turała, 1969), mohou se v této oblasti zřejmě oba typy setkávat, což přináší otázku, zda a jakým způsobem spolu různé ploidní úrovně tohoto druhu interagují. Diploidní cytotyp je naopak znám pouze z oblastí mediteránu.

V rámci takto široce pojatého druhu *R. trichophyllus* bylo odhaleno několik odlišných variant úseku ITS, což naznačuje polyfyletický charakter tohoto taxonu (Bobrov et al., 2015, Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Na našem území byly objeveny dva cytotypy v rámci jedné ploidní úrovně (tetraploidní). Prvním je typ s menším genomem, který je spíše mezofilní, zpravidla jednoletý, subtilní, má krátké listy s menším množstvím úkrojků a roste hlavně v mezotrofních vodách ve středních polohách. Druhým je potom typ s větším genomem, jež je teplomilný, zpravidla vytrvalý, mohutnější, má v průměru větší květy než typ s menším genomem a morfologicky tvoří přechod mezi cytotypem *R. trichophyllus* s menším genomem a druhem *R. aquatilis*. Roste v mezotrofních až přirozeně eutrofních vodách, v nížinách a teplých pahorkatinách. Na našem území jsou tyto dva typy vzájemně vikariantní. Výsledky ze sekvenování nekódujících úseků chloroplastové DNA a úseku ITS jaderné ribozomální DNA naznačují existenci dalších kryptických taxonů v rámci obou zmíněných cytotypů (Prančl et al., unpubl.).

## 5.1. Otázky

- Jaký je vztah skandinávského hexaploidního *R. trichophyllus* k tetraploidním typům z území střední Evropy? Jaké jsou vztahy mezi dalšími zjištěnými liniemi *R. trichophyllus* agg.?

- Jakým způsobem koreluje karyologická a cytotypová variabilita v rámci *R. trichophyllus* agg. s morfologickými znaky rostlin?
- Probíhá křížení mezi jednotlivými kryptickými liniemi *R. trichophyllus* agg.? Pokud ano, existuje nějaký preferovaný směr tohoto křížení?
- Je výskyt jednotlivých evolučních linií *R. trichophyllus* agg. sympatrický? Liší se tyto linie ve svých ekologických nárocích?

## 5.2. Metodika

K řešení výše zmíněných otázek budou použity metody průtokové cytometrie a sekvenace DNA, s jejichž pomocí se již v sekci *Batrachium* podařilo odhalit několik morfologicky neodlišitelných kryptických taxonů. Pro zhodnocení morfologických znaků bude dále provedena morfometrická analýza.

### 5.2.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je metoda využívaná v botanice zejména ke stanovení množství obsahu jaderné DNA v buňce. Obsah DNA je poté udáván v absolutních jednotkách, tedy v pikogramech (pg) či jako počet párů bazí (bp) nebo v relativních jednotkách jako tzv. DNA ploidie (Doležel et al., 2007b). Principem této techniky je optická analýza částic (Shapiro, 2005). Nejprve probíhá příprava rostlinného materiálu – zkoumaný vzorek je spolu s vhodným rostlinným standardem rozsekán a smísen s pufrem pro odstranění sekundárních metabolitů. Následně je přidáno specifické barvivo, jež se váže k nukleové kyselině. Takto obarvené částice materiálu (jádra) jsou v průtokovém cytometru unášeny proudem kapaliny úzkou kapilárou a po jejich osvětlení barvivo na ně navázané emituje záření. Fluorescenci přístroj detekuje a zaznamenaná relativní intenzitu fluorescence, která potom odpovídá množství DNA v jádrech (Suda, 2011). Průtokovou cytometrií často můžeme identifikovat jednotlivé taxony, které nejsme schopni odlišit na základě morfologie, a rovněž touto metodou můžeme odhalit polyploidy a hybridy (Suda, 2011).

Tato metoda nám však dává informaci pouze o celkovém množství DNA, nikoli o počtu chromozomů, proto je třeba ji kombinovat s klasickou karyologií, abychom mohli z cytometrických výsledků dále určovat ploidní úroveň. Karyologické ověření materiálu je vhodné i pro odhalení aneuploidie, k čemuž je průtoková cytometrie u skupin s vysokým počtem chromozomů zpravidla málo citlivá (Suda, 2011). Ačkoli lze v některých případech s úspěchem využít dehydratované vzorky (Suda & Trávníček, 2006), pro přesné analýzy je u

většiny rostlin nezbytné analyzovat čerstvý materiál. Nutnost dopravit rostliny do laboratoře v živém stavu je dalším limitujícím faktorem cytometrických analýz (Doležel & Bartoš, 2005).

### **5.2.2. Molekulární metody**

Bude využito hlavně sekvenování vybraných úseků jaderné a chloroplastové DNA (podrobněji viz níže). Jelikož u hybridů a alopolyploidů je více genomových kopií od různých rodičů, jsou sekvence úseku ITS často polymorfické. Pro získání jednotlivých kopií úseku je využíváno bakteriální klonování, které je však drahé a zdlouhavé. Alternativu nabízí sekvenování dalších generací (NGS – next generation sequencing), které nám navíc dokáže často odhalit i varianty ITS, které už jsou v sekvenci téměř úplně eliminované (Griffin et al., 2011).

Z molekulárních metod by pro odlišení blízce příbuzných taxonů mohly být díky vysokému polymorfismu využitelné také mikrosatelity (SSR – single sequence repeats). Při použití u polyploidů však u nich nelze vyhodnocovat kodominanci. Jejich další nevýhodou je nutnost použití specifických primerů, jejichž vytvoření je nákladné a časově náročné. Další možností pro získání těchto primerů by byla jejich cross-amplifikace, tedy optimalizace podle již známých sekvencí blízce příbuzného druhu. To se však již v minulosti s použitím jiných druhů rodu *Ranunculus* nezdařilo, a proto nebude v práci tato metoda využita.

#### **5.2.2.1 Sekvence DNA**

Při sekvenování DNA nám informaci pro rozlišení jednotlivých taxonů dávají bodové mutace, čili záměny jednotlivých nukleotidů (SNP – single nucleotid polymorphism) a délkové polymorfismy (INDEL – insertion, deletion), způsobené vložením nebo vystřížením nukleotidů. Nejdéle používanou metodou je klasické (Sangerovské) sekvenování. Při této metodě se předem amplifikované a přečištěné molekuly studovaného úseku přidají do reakční směsi obsahující jeden primer, DNA polymerázu, dostatečné množství čtyř základních deoxyribonukleotidů a fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidů. V místě zařazení dideoxyribonukleotidů do nově syntetizovaného řetězce syntéza skončí a proto díky jejich přítomnosti získáme různě dlouhé úseky DNA vzdálené vždy o jeden nukleotid. Ty potom na základě jejich mobility putují v elektroforetické trubičce automatického sekvenátoru, kde jsou přístrojem zaznamenány laserem ozářené dideoxyribonukleotidy s různou fluorescencí. Získáme tak přesnou pozici jednotlivých nukleotidů, které studovanou DNA tvoří, a můžeme

srovnávat studované jedince na základě přítomnosti polymorfismů mezi jejich DNA (Krak, 2011).

U rostlin se obecně velmi často sekvenuje ribozomální jaderná DNA, a to úsek ITS (Internal Transcribed Spacer – prepisovaný mezerník mezi geny pro velkou a malou ribozomální podjednotku), který u řady skupin vykazuje vhodnou úroveň variability pro odlišení jednotlivých druhů. U lukušníků bylo již sekvenování tohoto úseku úspěšně použito např. ve studiích Hörandl et al., 2005, Telford et al., 2011, Emadzade, 2012, Hörandl & Lumbreras, 2014, Bobrov et al., 2015 a Zalewska-Gałosz et al., 2015. Tento úsek může podléhat jevu zvanému koncertovaná evoluce (concerted evolution), kdy dochází k homogenizaci sekvencí DNA taxonů vzniklých hybridizací (Bailey et al., 2003). K tomu může docházet v různé míře. Buď sekvence jednoho rodičovského taxonu úplně nahradí tu druhou, nebo se udrží nový typ sekvencí, jakási chiméra sekvencí obou taxonů. Oproti původnímu předpokladu, že homogenizace postupně probíhá u všech organismů, se ukazuje, že tento proces neprobíhá u všech taxonů stejně rychle a tudíž můžeme najít nehomogenizovanou jadernou ribozomální DNA jak u recentních hybridů, tak i u některých starých hybridogenních evolučních linií (Krak, 2011). U lukušníků byl ITS polymorfismus v rámci jednoho jedince nalezen u četných hybridogenních polyploidních taxonů jako je například *R. penicillatus*, sekvence zde nejsou homogenizovány a proto nám podávají cennou informaci o evoluční historii (Zalewska-Gałosz et al., 2015).

Kromě jaderné DNA je k sekvenování vhodná také chloroplastová DNA, díky níž můžeme sledovat evoluci po mateřské linii a tudíž i směr hybridizace. U lukušníků byl již použit například úsek *matK* (úsek kódující geny pro protein intronová maturáza, jež se účastní splicingu intronů) (Koga et al., 2008, Zalewska-Gałosz et al., 2015) nebo nekódující úseky *rpl32-trnL* a *psbE-petL* (Bobrov et al., 2015). Chloroplastová DNA je obecně konzervativnější než jaderná DNA a díky jejímu haploidnímu charakteru v ní dochází k rychlejší fixaci alel, přesto v ní můžeme najít úseky dostatečně variabilní pro odlišení některých druhů. Jelikož je chloroplastová DNA maternálně dědičná a nedochází v ní k rekombinaci, je zde malá variabilita v rámci jedince, zároveň ale neposkytuje informace o hybridizaci, a proto je nutno analýzy chloroplastové DNA porovnávat s výsledky sekvenace úseků jaderné DNA (Krak, 2011). V rámci navazující diplomové práce budou sekvenovány dva úseky chloroplastové DNA, a to *rpl32-trnL* a 3'*rps16*-5'*trnK*. Ty byly pro lukušníky vybrány otestováním deseti různých úseků, jež byly publikovány jako nejvariabilnější úseky chloroplastové DNA (Prančl et al., unpubl).



### 5.2.3. Morfometrická analýza

Morfometrická analýza je metodou sloužící ke zhodnocení variability fenotypových znaků. Tradiční morfometrické přístupy (*distance-based morphometrics*) jsou založeny hlavně na kvantitativních analýzách vzdáleností a úhlů struktur. Při tomto přístupu však nelze využít některých tvarových rysů, proto se stále častěji využívá takzvaná geometrická morfometrika, při níž je objekt analyzován tak, aby bylo charakterizováno jeho tvarové uspořádání. Geometrická morfometrika využívá tzv. landmarks, tedy shodné body u různých objektů. Analýza poté vychází ze srovnávání jejich pozic (Marhold & Suda, 2002).

Morfometrická analýza byla v sekci *Batrachium* již použita ve studii zaměřené na proměnlivost listů a korunních lístků u druhů *R. peltatus*, *R. baudotii*, *R. saniculifolius*, *R. tripartitus* a *R. trichophyllus* z území Řecka (Dahlgren & Svensson, 1994). Pro klasifikaci skupin na základě jejich znaků bylo využito shlukovací analýzy. Ke stanovení znaků vhodných pro odlišení předem vymezených skupin byla použita testovací metoda kanonická diskriminační analýza. Výsledkem byla velká variabilita mezi populacemi, což mohlo být ovlivněno absencí vhodného kritéria pro definici morfologických skupin použitých pro analýzu (Dahlgren & Svensson, 1994).

### 5.3. Výsledky předběžných analýz pomocí průtokové cytometrie

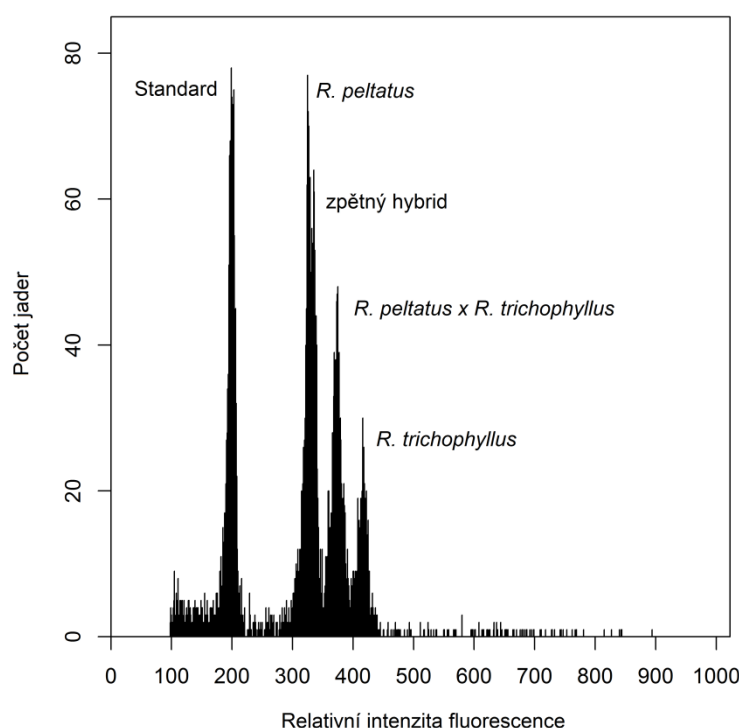
Pro analýzu dle standardní dvoustupňové metodiky (Doležel et al., 2007a) za použití fluorescenčního barviva PI (propidium iodid) bylo použito padesát tři jedinců z celkem dvaceti populací. Rostliny byly sbírány v České republice v okresech Jičín, Klatovy, Kolín, Pardubice a Plzeň jih. Jako interní standard byla použita *Bellis perennis*.

Výsledky předběžných analýz pomocí průtokové cytometrie dokazují, že v rámci sekce *Batrachium* jsme na základě velikosti genomu alespoň v rámci České republiky schopni rozlišit i homoploidní taxony. Zároveň byla potvrzena existence dvou cytotypů u druhu *R. trichophyllus*, a to cytotypu s větším genomem (*R. trichophyllus* "větší") a cytotypu s menším genomem (*R. trichophyllus* "menší"). Pro analýzu byly použity chromozomové počty stanovené pro jednotlivé druhy na území České republiky.

**Tab. 5 – Výsledky předběžných analýz cytotypové variability**

druh	N	ploidie	2C [pg]	SD	SE	1Cx [pg]
<i>R. circinatus</i>	8	2x	6,12	0,028	0,010	3,06
<i>R. peltatus</i>	15	4x	7,24	0,027	0,007	1,81
<i>R. rionii</i>	5	2x	5,79	0,013	0,006	2,90
<i>R. trichophyllus</i> „menší“	20	4x	9,65	0,058	0,013	2,41
<i>R. trichophyllus</i> „větší“	5	4x	10,72	0,060	0,027	2,68

Při analýze jedinců ze smíšené populace druhů *R. peltatus* a *R. trichophyllus* z lokality Raputovský rybník (Hvoždany, okres Příbram) byla odhalena přítomnost primárních i zpětných hybridů zmiňovaných druhů (viz Obr. 5).



**Obr. 5 – Výsledný histogram z průtokového cytometru. Na základě rozdílů ve velikosti genomu zde můžeme odlišit oba rodičovské druhy, primárního hybridu a produkt zpětného křížení, který se velikostí genomu podobá spíše druhu *R. peltatus*.**

## 6. Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o mikroevolučních procesech probíhajících uvnitř sekce *Batrachium*. V evoluci sekce hrají hlavní roli procesy hybridizace a polyploidizace, které v kombinaci s morfologickou redukcí a fenotypickou plasticitou vedou k její značné komplikovanosti. Práce popisuje taxonomickou a systematickou problematiku skupiny s důrazem na situaci na území Evropy, kde vykazují lakušníky největší diverzitu v rámci celého jejího areálu rozšíření. Díky využití metod průtokové cytometrie a sekvenování DNA byla odhalena přítomnost kryptických taxonů, jež jsou příkladem paralelní evoluce různých evolučních linií. Takovým kryptickým komplexem je v Evropě i *Ranunculus trichophyllus* agg., jehož problematika bude předmětem navazující diplomové práce.

## 7. Použitá literatura

- Albert, V. A., Barbazuk, W. B., Der, J. P., Leebens-Mack, J., Ma, H., Palmer, J. D., ... & Soltis, P. S. (2013). The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. *Science*, 342, 1241089.
- Angiosperm Phylogeny Group (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1–20.
- Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A., & Hughes, C. E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 435–455.
- Benson, L. (1940). The North American subdivisions of *Ranunculus*. *American Journal of Botany*, 27, 799–807.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S. et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148–155.
- Bobrov, A. A., Zalewska-Gałosz, J., Jopek, M., & Movergoz, E. A. (2015). *Ranunculus schmalhauseni* (section *Batrachium*, Ranunculaceae), a neglected water crowfoot endemic to Fennoscandia—a case of rapid hybrid speciation in postglacial environment of North Europe. *Phytotaxa*, 233, 101–138.
- Briggs, D., & Walters, S. M. (2016). *Plant variation and evolution*. Cambridge University Press.
- Carta, A., Bedini, G., Foggi, B., & Probert, R. J. (2012). Laboratory germination and seed bank storage of *Ranunculus peltatus* subsp. *baudotii* seeds from the Tuscan Archipelago. *Seed Science and Technology*, 40, 11–20.
- Cook, C. D. K. (1962). Studies on *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. I. Chromosome numbers. *Watsonia*, 5, 123–126.
- Cook, C. D. K. (1963). Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. II. General morphological considerations in the taxonomy of the subgenus. *Watsonia*, 5, 294–303.

- Cook, C. D. K. (1966a). A monographic study of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 6, 47–237.
- Cook, C. D. K. (1966b). Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray. III. *Ranunculus hederaceus* L. and *R. omiophyllus* Ten. *Watsonia*, 6, 246–259.
- Cook, C. D. K. (1969). On the determination of leaf form in *Ranunculus aquatilis*. *New Phytologist*, 68, 469–480.
- Cook, C. D. K. (1970). Hybridization in the evolution of *Batrachium*. *Taxon*, 161–166.
- Cook, C. D. K., González, G. L., Grau, H. R. J. (1986). Subgen. I. *Batrachium* (DC.) A. Gray. In: Castroviejo, S. (ed.), *Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. I, *Lycopodiaceae - Papaveraceae*. Madrid: Real Jardín Botánico de Madrid.
- Dahlgren, G. (1991). Karyological investigations in *Ranunculus* subg. *Batrachium* (*Ranunculaceae*) on the Aegean islands. *Plant Systematics and Evolution*, 177, 193–211.
- Dahlgren, G. (1992). *Ranunculus* subgenus *Batrachium* on the Aegean islands and adjacent areas: nectary types and breeding system. *Nordic Journal of Botany*, 12, 299–310.
- Dahlgren, G. (1993). *Ranunculus penicillatus* in Norden. *Nordic Journal of Botany*, 13, 593–605.
- Dahlgren, G. (1995). Differentiation patterns in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (*Ranunculaceae*). In *Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae*, 305–317. Vienna: Springer.
- Dahlgren, G., & Svensson, L. (1994). Variation in leaves and petals of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* on the Aegean Islands, analysed by multivariate analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 114, 253–270.
- de Candolle, A. P. (1818). *Regni Vegetabilis Systema Naturale...*, 1, 232–233, Parisiis: Sumptibus sociorum Treuttel et Würtz.
- Diosdado, J. C., Pastor, J. E., & Valdés, B. (1993). Contributions to the karyological study of the genus *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray from the Iberian Peninsula. *Botanical journal of the Linnean Society*, 112, 75–87.

- Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95, 99–110.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007a). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2, 2233–2244.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007b). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Weinheim: Wiley.
- Dvořák, F., & Dadáková, B. (1984). Chromosome counts and chromosome morphology of some selected species. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 19, 41–70.
- Englmaier, P. (2016). *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. *Neulreichia*, 8, 97–125.
- Garbey, C., Thiébaud, G., & Muller, S. (2006). An experimental study of the plastic responses of *Ranunculus peltatus* Schrank to four environmental parameters. *Hydrobiologia*, 570, 41–46.
- Gray, A. (1886). Contributions to American Botany. A revision of the North American *Ranunculi*. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 21, 363–413.
- Gray, S. F. (1821). A Natural Arrangement of British Plants, 2, 720.
- Griffin, P. C., Robin, C., & Hoffmann, A. A. (2011). A next-generation sequencing method for overcoming the multiple gene copy problem in polyploid phylogenetics, applied to *Poa* grasses. *BMC biology*, 9, 19.
- Grillas, P., Garcia-Murillo, P., Geertz-Hansen, O., Marbá, N., Montes, C., Duarte, C. M., Tan Ham, L. & Grossmann, A. (1993). Submerged macrophyte seed bank in a Mediterranean temporary marsh: abundance and relationship with established vegetation. *Oecologia*, 94, 1–6.
- Gulich, V. (2012). Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. *Preslia* 84, 631–645.
- Harrison, R. G. (1993). *Hybrid zones and the evolutionary process*. New York: Oxford University Press.

- Hegarty, M. J., & Hiscock, S. J. (2005). Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist*, 165, 411–423.
- Hong, D. Y. (1991). A biosystematic study on *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in S Sweden. *Nordic J. Bot*, 11, 41–59.
- Hörandl, E., & Emadzade, K. (2012). Evolutionary classification: A case study on the diverse plant genus *Ranunculus* L. (*Ranunculaceae*). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14, 310–324.
- Hörandl, E., Paun, O., Johansson, J. T., Lehnebach, C., Armstrong, T., Chen, L., & Lockhart, P. (2005). Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (*Ranunculaceae*) inferred from ITS sequence analysis. *Molecular phylogenetics and evolution*, 36, 305–327.
- Husák Š., Hejný S., & Slavík B. (1988). *Batrachium* (DC.) S.F. Gray – lakušník. In: Hejný S., & Slavík B. (eds.), *Květena České socialistické republiky* 1: 446–456, Praha: Academia.
- Kaplan Z. (2002). *Batrachium* (DC.) S. F. Gray. In: Kubát, K. (ed.), *Klíč ke květeně České republiky*, 121–124, Praha: Academia.
- Kaplan, Z., & Fehrer, J. (2011). Erroneous identities of *Potamogeton* hybrids corrected by molecular analysis of plants from type clones. *Taxon*, 60, 758–766.
- Kaplan, Z., Fehrer, J., & Hellquist, C. B. (2009). New hybrid combinations revealed by molecular analysis: The unknown side of North American pondweed diversity (*Potamogeton*). *Systematic Botany*, 34, 625–642.
- Koga, K., Kadono, Y., & Setoguchi, H. (2008). Phylogeography of Japanese water crowfoot based on chloroplast DNA haplotypes. *Aquatic Botany*, 89, 1–8.
- Krak, K. (2011). Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. In Mandák B., Krahulec F., & Hroudová Z. (eds.), *Zprávy České botanické společnosti*, 25, 21–42.
- Lambertini, C., Gustafsson, M. H., Baattrup-Pedersen, A., & Riis, T. (2017). Genetic structure of the submersed *Ranunculus baudotii* (sect. *Batrachium*) population in a lowland stream in Denmark. *Aquatic Botany*, 136, 186–196.

- Les, D. H., & Philbrick, C. T. (1993). Studies of hybridization and chromosome number variation in aquatic angiosperms: evolutionary implications. *Aquatic Botany*, 44, 181–228.
- Lumbreras, A., Molina, J. A., Benavent, A., Marticorena, A., & Pardo, C. (2014). Disentangling the taxonomy and ecology of South American *Ranunculus* subgen. *Batrachium*. *Aquatic Botany*, 114, 21–28.
- Lumbreras, A., Olives, A., Quintana, J. R., Pardo, C., & Molina, J. A. (2009). Ecology of aquatic *Ranunculus* communities under the Mediterranean climate. *Aquatic Botany*, 90, 59–66.
- Marhold, K. & Suda, J. (2002). *Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii*. Praha: Karolinum.
- Mason, A. S., & Pires, J. C. (2015). Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism?. *Trends in Genetics*, 31, 5–10.
- Měsíček, J., & Jarolímová, V. (1992). *List of chromosome numbers of the Czech vascular plants*. Praha: Academia.
- Měsíček, J., & Soják, J. (1995). Chromosome numbers of Mongolian Angiosperms. III. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 30, 445–453.
- Nielsen, S. L., & Sand-Jensen, K. (1993). Photosynthetic implications of heterophylly in *Batrachium peltatum* (Schränk) Presl. *Aquatic botany*, 44, 361–371.
- O'Donnell, J., Fryirs, K., & Leishman, M. R. (2014). Digging deep for diversity: riparian seed bank abundance and species richness in relation to burial depth. *Freshwater Biology*, 59, 100–113.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34, 401–437.
- Pollux, B. J. A., Jong, M. D. E., Steegh, A., Verbruggen, E., Van Groenendael, J. M., & Ouborg, N. J. (2007). Reproductive strategy, clonal structure and genetic diversity in populations of the aquatic macrophyte *Sparganium emersum* in river systems. *Molecular Ecology*, 16, 313–325.



- Prančl J., Koutecký P., Kaplan Z., Trávníček P., & Jarolímová V. (2017). Cryptic variation and hybridization in *Ranunculus* sect. *Batrachium* (*Ranunculaceae*) revealed by flow cytometry and chromosome counting. (in prep.)
- Prančl J., & Kaplan Z. (2017). Lakušníky, *Ranunculus* subg. *Batrachium*. In Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds.), *Klíč ke květeně České republiky*. (in press)
- Preston, C. D., Hollingsworth, P. M., & Gornall, R. J. (1998). *Potamogeton pectinatus* L.  $\times$  *P. vaginatus* Turcz. (*P.  $\times$  bottnicus* Hagstr.), a newly identified hybrid in the British Isles. *Watsonia*, 22, 69–82.
- Ridley, M. (2004). *Evolution*. Malden: Blackwell Publishing
- Rieseberg, L. H., & Soltis, D. E. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*, 5, 65–84.
- Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317, 910–914.
- Rich, T. C., & Jermy, A. C. (1998). *Plant crib 1998*. London: Botanical Society of the British Isles (BSBI).
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons.
- Schemske, D. W., & Lande, R. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution*, 41–52.
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C. W., Wall P. K. & Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96, 336–348.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Schemske, D. W., Hancock, J. F., Thompson, J. N., Husband, B. C., & Judd, W. S. (2007). Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species?. *Taxon*, 56, 13–30.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Soltis, P. S., Marchant, D. B., Van de Peer, Y., & Soltis, D. E. (2015). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 119–125.

Suda, J. (2011). Průtoková cytometrie a její využití v botanice. In Mandák B., Krahulec F., & Hroudová Z. (eds.), *Zprávy České botanické společnosti*, 25, 21–42.

Suda, J., & Trávníček, P. (2006). Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry Part A*, 69, 273–280.

Telford, A., O'Hare, M. T., Cavers, S., & Holmes, N. (2011). Can genetic bar-coding be used to identify aquatic *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC) A. Gray? A test using some species from the British Isles. *Aquatic Botany*, 95, 65–70.

Turała K. (1969). Cyto-taxonomical studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray from Poland. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 12, 9–20.

Turała K. (1970). Cyto-taxonomical studies in *Ranunculus fluitans* Lam. and *R. penicillatus* (Dumort.) Bab. from Lower Silesia (Poland). Preliminary report. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 13, 119–123.

Turała K., & Wołek J. (1971). A natural tetraploid hybrid of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* from the Nowy Targ Basin (Poland). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 14, 153–157.

Turała-Szybowska K. (1977). Karyological studies in *Ranunculus fluitans* Lam. from Thuringia and Vilnius with its surroundings. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 20, 1–9.

Turała-Szybowska K. (1978). Cyto-embryological studies in self-incompatible populations of *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. from Poland. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 21, 9–21.

Webster, S. D. (1988). *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. in Great Britain and Ireland. *Watsonia*, 17, 1–22.

Wells, C. L., & Pigliucci, M. (2000). Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3, 1–18.

Wiegand, G. (1988). Notes on Japanese *Ranunculus* subgenus *Batrachium*. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 39, 117–132.

- Wiegand, G., & Herr, W. (1983). Taxonomie und Verbreitung von *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in niedersächsischen Fließgewässern unter besonderer Berücksichtigung des *Ranunculus penicillatus* Komplexes. *Gottinger floristische Rundbriefe* 17: 101–150
- Wissemann, V. (2007). Plant evolution by means of hybridization. *Systematics and Biodiversity*, 5, 243–253.
- Wolff, P., & Schwarzer, A. (1991) *Ranunculus rionii* Lager - eine neue Wasserpflanze in Deutschland. *Floristische Rundbriefe*, 25, 69–85.
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 13875–13879.
- Zalewska-Gałosz, J., Jopek, M., & Ilnicki, T. (2015). Hybridization in *Batrachium* group: Controversial delimitation between heterophyllous *Ranunculus penicillatus* and the hybrid *Ranunculus fluitans* × *R. peltatus*. *Aquatic Botany*, 120, 160–168.